

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**  
**STUDIJ MEDICINE**

**Antonija Kašuba**

**MIKROSATELITNA NESTABILNOST**  
**ADENOKARCINOMA DEBELOG**  
**CRIJEVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI**  
**STUDIJ MEDICINE**

**Antonija Kašuba**

**MIKROSATELITNA NESTABILNOST**  
**ADENOKARCINOMA DEBELOG**  
**CRIJEVA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Osijek, na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Ksenija Marjanović, dr. med., specijalist patološke anatomije

Rad ima 30 listova i 16 tablica.

## PREDGOVOR RADU

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Kseniji Marjanović, dr. med. na posvećenom vremenu, pristupačnosti i stručnim savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Nadalje, zahvaljujem svim prijateljima i kolegama na potpori i razumijevanju koje su mi pružali tijekom ovih godina studiranja.

Neizmjereno hvala mojoj obitelji koji su mi oduvijek bili podrška i nikada nisu prestali vjerovati u mene. Ovaj uspjeh postignut je zahvaljujući njihovoj motivaciji, pomoći, strpljenju, razumijevanju, potpori i bezuvjetnoj ljubavi.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Anatomija debelog crijeva .....	1
1.2. Epidemiologija .....	1
1.3. Etiologija .....	2
1.4. Klinička slika .....	2
1.5. Patologija .....	3
1.6. Kromosomska nestabilnost .....	5
1.7. Mikrosatelitska nestabilnost .....	6
1.7.1. Lynchov sindrom .....	6
1.7.2. Sporadična mikrosatelitska nestabilnost .....	6
1.8. Dijagnostika .....	7
1.9. Liječenje .....	7
1.10. Preživljenje .....	8
2. CILJEVI .....	9
3. ISPITANICI I METODE .....	10
3.1. Ustroj istraživanja .....	10
3.2. Ispitanici (materijal) .....	10
3.3. Metode .....	10
3.4. Statističke metode .....	10
4. REZULTATI .....	12
5. RASPRAVA .....	20
6. ZAKLJUČAK .....	23
7. SAŽETAK .....	24
8. SUMMARY .....	25
9. LITERATURA .....	26
10. ŽIVOTOPIS .....	30

## POPIS KRATICA

CRC	kolorektalni karcinom
FAP	obiteljska adenomatozna polipoza (engl. <i>familial adenomatous polyposis</i> )
HNPCC	nasljedni nopolipozni kolorektalni karcinom (engl. <i>hereditary nonpolyposis colon cancer</i> )
LS	Lynchov sindrom
AJCC	Američko društvo za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancer</i> )
AC	Astler – Coller
TNM	tumor, nodus, metastaza (međunarodna klasifikacija raka)
UICC	Međunarodna unija za borbu protiv raka (franc. <i>Union Internationale Contre le Cancer</i> )
CIP	kromosomska nestabilnost (engl. <i>chromosomal instability pathway</i> )
KRAS	engl. <i>oncogene – Kirsten Rat sarcoma virus</i>
APC	adenomatozna polipoza kolona (engl. <i>adenomatous polyposis coli</i> )
MSI	mikrosatelitska nestabilnost (engl. <i>microsatellite instable</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
MMR	geni za popravak DNA (engl. <i>mismatch repair</i> )
MLH1	engl. <i>MutL Protein Homolog 1</i>
MSH2	engl. <i>MutS Protein Homolog 2</i>
MSH6	engl. <i>MutS Protein Homolog 6</i>
PMS2	engl. <i>Postmeiotic Segregation Increased 2</i>
BRAF	engl. <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CEA	karcinoembrionalni antigen
MSS	mikrosatelitna stabilnost (engl. <i>microsatellite stability</i> )
5-FU	5-fluorouracil
KBCO	Klinički bolnički centar Osijek
PD -1	engl. <i>programmed death - 1</i>

## 1. UVOD

### 1.1. Anatomija debelog crijeva

Debelo crijevo započinje od ileocekalnog ušća, a završava na analnom otvoru, duljine je približno 1,6 m. Dijelimo ga na četiri dijela: cekum, kolon, rektum i analni kanal. Unutar kolona razlikuju se četiri dijela: uzlazni (*colon ascendens*), poprečni (*colon transversum*), silazni (*colon descendens*) i sigmoidni kolon (*colon sigmoideum*) (1, 2).

### 1.2. Epidemiologija

Kolorektalni karcinom (CRC) predstavlja treći po redu malignitet u razvijenom svijetu i jedan od vodećih uzroka smrti povezane s rakom (3). Prema Registru za rak Republike Hrvatske kod muškaraca nalazi se na trećem mjestu po učestalosti, iza karcinoma pluća i karcinoma prostate te čini 16 % svih karcinoma. Kod žena se nalazi na drugom mjestu po učestalosti, iza karcinoma dojke i čini 13 % svih karcinoma (4). Najčešće se javlja u razvijenim zemljama kao što su Zapadna Europa, Sjeverna Amerika, Novi Zeland, Australija te postoji povećana incidencija obolijevanja kod osoba koje su migrirale iz nerazvijenih u razvijenije zemlje (5). Rizik razvoja CRC-a povećava se nakon 40. godine kod muškarca i kod žena s vrhom pojavljivanja između 60. i 75. godine života (6). Incidencija CRC-a u područjima s visokim učestalostima iznosi od 20 do 37 na 100.000 stanovnika godišnje (7). CRC su rijetki prije 40. godine života, osim kod pojedinaca s genetskom predispozicijom ili onih s kroničnim upalnim crijevnim bolestima (8). Povećani rizik od obolijevanja počinje rasti nakon 35. godine života, a 90 % svih slučajeva otkrije se iza 50. godine života. Incidencija CRC-a raste sa starošću i u pravilu se udvostručuje u svakom desetljeću nakon 40. godine života (9). Stopa incidencije CRC-a za ispitanike starije od 70 godina iznosila je 47,3 % od svih zabilježenih slučajeva karcinoma u 2000. godini te se predviđa porast na 63,8 % u 2020. godini (10). Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, godišnje u Hrvatskoj od CRC-a oboli oko 2800 osoba te s obzorom na visoku učestalost CRC-a, u našoj zemlji provodi se Nacionalni program prevencije i ranog otkrivanja CRC-a od studenog 2007. godine (11).



### 1.3. Etiologija

Rizični čimbenici povezani s povećanim rizikom od CRC-a su pretilost, tjelesna neaktivnost, pušenje, konzumacija alkohola i „zapadna prehrana“ (8). „Zapadna prehrana“ koja se sastoji prvenstveno od prerađenog mesa, crvenog mesa, brze hrane i niske razine povrća i voća povezana je s povećanim rizikom od CRC-a (12). Heterociklički amini sadržani u mesu kuhanom na visokim temperaturama imaju kancerogeni učinak. Nitriti ili nitrati dodani u meso povećavaju egzogenu izloženost nitrozaminima (13). Postoji povezanost sa sjedilačkim načinom života i povećanim obolijevanjem od CRC-a (14). Pojedini lijekovi iz skupine neselektivnih inhibitora ciklooksigenaze kao što su aspirin i piroksikam pokazali su protektivno djelovanje na veličinu i broj kolorektalnih polipa (10). Upalne bolesti crijeva, ulcerozni kolitis i Chronova bolest kolona, potencijalne su prekancerozne bolesti, osobito u slučaju dugog trajanja bolesti. Čimbenik u nastanku CRC-a je i terapijsko zračenje zdjelice (8). Povećana učestalost CRC-a povezana je s nekim nasljednim bolestima kao što su obiteljska adenomatozna polipoza (FAP, engl. *familial adenomatous polyposis*) te Peutz-Jeghersov sindrom, nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC, engl. *hereditary nonpolyposis colon cancer*) i Lynchov sindrom (LS) (15).

### 1.4. Klinička slika

Većina bolesnika s CRC-om dugo je asimptomatska te kako bolest napreduje pojavljuju se prvi simptomi anemije, kao što su klonulost i zaduha, zbog kroničnog krvarenja iz tumora (2, 9). Tek kada veličina tumora bude dovoljna da opstruira lumen nastupaju intermitentna bol u trbuhu, nadutost, poremećaj pražnjenja stolice, proljev, konstipacija, sužavanje stolice, tenezmi u donjem dijelu trbuha i hematohezija (9, 16). Opstrukcija s razvojem ileusa ili perforacija s peritonitisom predstavljaju komplikacije kasnog CRC-a (8, 9). Neki simptomi učestaliji su ovisno o lokalizaciji. Simptomi se kod desnostranih karcinoma zbog šireg lumena javljaju u uznapređovalom stadiju te se najčešće očituju zamorom, slabošću i sideropeničnom anemijom. Krvarenje je obično skriveno, a ponekad tumori narastu prije pojave simptoma toliko da se mogu napipati kroz abdominalnu stijenu. Kod lijevostranih karcinoma češće se javljaju karcinomi prstenastog oblika jer je kolon uža, a neki od ranih simptoma mogu biti opstrukcija lumena crijeva. Prisutni su i paradoksalni proljevi, odnosno konstipacija se izmjenjuje s razdobljima

proljevastih stolica, a alarmantan znak koji upućuje na distalnu lokalizaciju tumora pojava je svježe krvi u stolici i/ili krv koja oblaže stolicu (2, 7, 9). Sistemne manifestacije CRC-a uključuju neobjašnjiv gubitak apetita, neobjašnjivi gubitak težine, mučninu, povraćanje, žuticu, anemiju, slabost i umor, te su oni obično znakovi uznapredovale bolesti (8). S obzirom na to da je kod mnogih bolesnika CRC asimptomatski, prema preporukama Američkog društva za rak (AJCC, engl. *American Joint Committee on Cancer*) treba raditi redoviti probir za CRC, počevši od 45. godine života (12).

### 1.5. Patologija

Oko 50 % tumora nastaje u rektosigmoidnom dijelu, 20 % u cekumu i ascendentnom kolonu, 15 % u poprečnom kolonu i 15 % u descendentnom kolonu. CRC može rasti egzofitično, endofitično i difuzno infiltrativno te prstenasto s posljedično suženjem lumena (9). Svi adenokarcinomi debelog crijeva šire se izravno kroz crijevnu stijenku u okolne strukture te metastatski kroz limfne i krvne žile. Tumor se u početku širi u limfne čvorove, a poslije se može proširiti izravno po peritoneumu (karcinomatosa peritoneuma) te putem portalne vene u jetru. Nisko smješteni rektalni karcinomi šire se najprije u pluća donjom šupljom venom, a poslije može doći do metastatskog rasapa u druge organe tijela (8). Histološki se razlikuje nekoliko tipova CRC-a (adenokarcinom, mucinozni adenokarcinom, medularni karcinom, karcinom stanica prstena pečatnjaka, nediferencirani karcinom, adenoskvamozni karcinom, pločasti, karcinom malih stanica i drugi rjeđe zastupljeni tipovi) (5, 8). Većina CRC-a su adenokarcinomi, koji čine 95 % svih slučajeva CRC-a, koji nastaju iz prethodnih adenoma, a proces transformacije adenoma u karcinom poznat je kao „adenom - displazija - karcinom slijed“ (8, 15). Prema stupnju diferencijacije mogu biti dobro diferencirani (> 95 % tumora čini žljezdane komponenta), umjereno diferencirani (50 – 95 % žljezdane komponente) te slabo diferencirani (< 50 % žljezdane komponente). Mucinozni adenokarcinomi, medularni karcinomi, i nediferencirani karcinomi rijetke su histološke vrste i općenito su povezani s naprednim stadijem i lošijim ishodom bolesti (8, 17).

Za predviđanje ponašanja tumora te preživljena pacijenata izuzetno je važno ispravno dijagnosticiranje patološkog stadija tumora. Proširenost CRC-a u vrijeme dijagnoze ključni je čimbenik koji se koristi za definiranje liječenja i procjenu mogućnosti uspješnog liječenja.

Najčešće korištene klasifikacije, koje nam daju bitne informacije o specifičnom liječenju karcinoma te prognozi, jesu klasifikacija po Dukesu, i više primijenjena njezina modifikacija prema Astler – Colleru (AC) te TNM klasifikacija (T – tumor; N – nodus; M – metastaza) (8, 18).

Patohistološki pregled tumora i regionalnih limfnih čvorova najčešće se definira klasifikacijom po Dukesu i modificiranom klasifikacijom prema AC-u (8). Amerikanci Astler i Coller 1954. godine predstavili su modifikaciju Dukesove klasifikacije, koja je jedan od najčešćih sustava koji se danas koristi za CRC (Tablica 1.1.) (6).

Tablica 1.1. Modificirana Dukes klasifikacija prema Astler – Colleru.

STADIJ TUMORA	PROŠIRENOST TUMORA
STADIJ A	tumor ograničen na mukozu
STADIJ B1	tumor prožima <i>muscularis propriu</i> , ali je ne probija; limfni čvorovi nisu zahvaćeni
STADIJ B2	tumor probija <i>muscularis propriu</i> ; limfni čvorovi nisu zahvaćeni
STADIJ C1	tumor prožima <i>muscularis propriu</i> , ali je ne probija; limfni čvorovi zahvaćeni
STADIJ C2	tumor probija <i>muscularis propriu</i> ; limfni čvorovi zahvaćeni
STADIJ D	udaljene metastaze

Najčešće korišteni sustav kliničkog stadija bolesti je TNM sustav međunarodne unije za borbu protiv raka (UICC, franc. *Union Internationale Contre le Cancer*) i smatra se najpouzdanijim sustavom određivanja proširenosti primarnog tumora te njegovih regionalnih i udaljenih metastaza (8). Najnovije TNM smjernice objavljene u AJCC-u, čija je zadnja revizija kao osmo izdanje, dostupno od studenog 2016. godine (18). Patološka TNM klasifikacija temelji se na pregledu resektiranog tkiva uključujući pregled najmanje 12 limfnih čvorova ako je riječ o operacijskom zahvatu, a ako je riječ o palijativnom zahvatu ili preoperativnoj radioterapiji i kemoterapiji može ih biti i manje (19). Svakom TNM stadiju pridružen je stadij bolesti s obzirom na koji se određuje terapija i prognoza bolesti (Tablica 1.2.) (18).

Tablica 1.2. AJCC\* prognostički stadij

AJCC* prognostičke grupe stadija					
STADIJ	T <sup>†</sup>	N <sup>‡</sup>	M <sup>§</sup>	Dukes	MAC <sup>  </sup>
<b>0</b>	T in situ	N0	M0	/	/
<b>I</b>	T1,T2	N0	M0	A	A/B1
<b>IIA</b>	T3	N0	M0	B	B2
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0	B	B2
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0	B	B3
<b>IIIA</b>	T1,T2	N1/N1c	M0	C	C1
<b>IIIA</b>	T1	N2a	M0	C	C1
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
<b>IIIB</b>	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
<b>IIIB</b>	T1-T2	N2b	M0	C	C1
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0	C	C2
<b>IIIC</b>	T3-T4	N2b	M0	C	C2
<b>IIIC</b>	T4b	N1-N2	M0	C	C3
<b>IVA</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a	/	/
<b>IVB</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b	/	/
<b>IVC</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c	/	/

\*AJCC, engl. *American Joint Committee on Cancer*, <sup>†</sup>T-tumor, <sup>‡</sup>N-nodus, <sup>§</sup>M-metastaza, <sup>||</sup>MAC-modificirana Astler – Collerova klasifikacija

## 1.6. Kromosomska nestabilnost

Genomske promjene u kromosomskoj nestabilnosti (CIP, engl. *chromosomal instability pathway*) uključuju aktivaciju proto-onkogeno (KRAS, engl. *oncogene – Kirsten Rat sarcoma virus*) i inaktivaciju tumor supresorskih gena APC (engl. *adenomatous polyposis coli*) i tumorskog proteina p53 (20). FAP je autosomno dominantni poremećaj uzrokovan mutacijom u APC genu. Gubitak APC gena pronađen je u više od 95 % sporadičnih CRC-a i u manjem broju adenoma (7). Bolesnici koji su pogođeni mutacijom počeli su imati kolorektalne adenome u drugom desetljeću, dosežući stotine ili tisuće do četvrtog desetljeća života. Bez profilaktičke proktokolektomije, gotovo će svi bolesnici imati CRC u dobi od 50 godina (15). Razvoj većine CRC-a vjeruje se da počinje s mutacijom APC tumorskog supresorskog gena (8). Značajna je i mutacija KRAS onkogeno koja potiče proliferaciju stanica, a koči programiranu staničnu smrt (9, 21).

### 1.7. Mikrosatelitska nestabilnost

Mikrosatelitsku nestabilnost (MSI, engl. *microsatellite instable*) CRC-a čini 15 – 20 % svih CRC-a i uključuje HNPCC, LS 3 % i sporadični MSI CRC 12 % (3, 22). MSI nastaje kao posljedica inaktivacije nekog od gena za popravak deoksiribonukleinske kiseline (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*), tj. inaktivacija MMR (engl. *mismatch repair*) gena uključenih u mehanizme popravka DNA (23). MLH1 (engl. *MutL Protein Homolog 1*), MSH2 (engl. *MutS Protein Homolog 2*), MSH6 (engl. *MutS Protein Homolog 6*) i PMS2 (engl. *Postmeiotic Segregation Increased 2*) glavni su proteini koji su uključeni u MMR sustav popravka DNA. MSI se očituje u negativnosti jednog ili dvaju različitih proteina (22, 24). Tip MSI tumora povezuje se i s mutacijama u onkogenim i tumor supresorskim genima kao što je BRAF (engl. *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*) (25). Mutiran BRAF gen dovodi do hiperproliferacije stanica i inhibicije apoptoze. BRAF mutacije prisutne su u 10 % CRC-a (22).

#### 1.7.1. Lynchov sindrom

Lynchov sindrom koji se također naziva HNPCC autosomno je dominantan sindrom s predispozicijom za nastanak i kolorektalnog i ekstra-kolorektalnih karcinoma (rak želuca najčešći je u muškaraca, a ginekološki tumori najčešći su u žena) (4, 23). Mutacije MSH2 i MLH1 čine gotovo 90 % mutacija zabilježenih u obiteljima s HNPCC. Bolesnici razvijaju tumore u ranoj dobi, često između 20. i 30. godine života (24). Neke obitelji s HNPCC-om imaju utvrđenu MSH6 i PMS2 mutaciju (26). Mutacije u MSH6 prisutne su u 10 – 20 % LS i 0,4 % svih karcinoma debelog crijeva s većim udjelom CRC-a dijagnosticiranog u mlađoj dobi (27). Osobe s PMS2 mutacijom imaju rizik za razvoj bolesti u mlađoj dobi nego ostale mutacije te postoji manji rizik od nastanka karcinoma udruženih s LS-om u odnosu na nositelje mutacija ostalih MMR gena (28).

#### 1.7.2. Sporadična mikrosatelitska nestabilnost

Mikrosatelitski nestabilni sporadični CRC nastaju kroz proces koji uključuje metiliranje CpG otoka u promotorima gena MMS. Metilacija se povećava s dobi, ubrzava se u debelom crijevu kao odgovor na kroničnu upalu. Oko 15 – 20 % svih CRC-a imaju MSI fenotip i oko dvije trećine tih tumora MSI-a sporadični su (29). Sporadični MSI obuhvaća odsutnost genetskih

promjena, a uključuje metiliranje MLH1 promotora te odsustvo MLH1 i PMS2 proteina i česte mutacije u BRAF genu (24). Metiliranje MLH1 gena odgovorno je za oko 80 % slučajeva u kojima je ekspresija MLH1/PMS2 proteina izgubljena. PMS2 protein oblikuje heterodimer s MLH1 proteinom te odsustvo MLH1 proteina zbog toga dovodi do gubitka i PMS2 proteina (30). Približno 50 % sporadičnih MMR slučajeva posljedica je BRAF mutacije. Za razliku od LS-a, sporadični slučajevi uključujući stariju dob u dijagnozi, dominantnost ženskog spola i povećanu stopu pušenja cigareta (29).

### 1.8. Dijagnostika

Kolonoskopija je „zlatni standard“ u dijagnostici CRC-a te osim dijagnostičke uloge ima i terapijsku ulogu, gdje se pri endoskopskom pregledu mogu ukloniti polipi te adenomi i karcinomi s minimalnom submukoznom invazijom (8). Rutinske opcije probira za CRC uključuju fekalne okultne krvne pretrage, fleksibilnu sigmoidoskopiju ili kolonoskopiju. Odraslim mlađima od 50 godina bez rizičnih čimbenika ne preporučuje se da se podvrgnu rutinskom pregledu kolona, dok se visokorizičnim bolesnicima preporučuje početak probiranja prije 50. godine. Visokorizični bolesnici su oni s poviješću bolesti na APC-u, HNPCC-a ili ulceroznog kolitisa. (12). U krvi je moguće pronaći karcinoembrionalni antigen (CEA) (21). Snimanje presjeka pomoću kompjutorizirane tomografije, magnetske rezonancije i transrektalnog ultrazvuka omogućuje procjenu dubina lokalne invazije tumora i prisutnost regionalnih i udaljenih metastaza. Irigografija s dvostrukim kontrastom također se koristi te scintigrafija i pozitronska emisijska tomografija (8, 16).

### 1.9. Liječenje

Metoda izbora u liječenju je kirurško liječenje. Vrstu kirurškog zahvata određuje smještaj tumora (lijeva ili desna hemikolektomija, resekcija poprečnog crijeva, resekcija sigme te rektuma). Kod bolesnika u stadiju 3 te u stadiju 2 uz radikalni kirurški zahvat primjenjuje se adjuvantna terapija utemeljena na primjeni 5-fluorouracila (5-FU) i leukovorina (16). MSI je bio povezan s lošijim odgovorom od MSS karcinoma na liječenje 5-FU. MSI tumori posebno su osjetljivi na liječenje irinotekanom (22). Demetilacija te ponovna ekspresija MLH1 i PMS2 obnavlja osjetljivost na 5-FU, sugerirajući da se demetiliranje može koristiti s drugim terapijskim

sredstvima za prevladavanje otpornosti na lijekove kod MSI CRC-a (20). *In vitro* istraživanja pokazuju da MSI CRC-i pokazuju osjetljivost na oksaliplatinu (29).

### 1.10. Preživljenje

Petogodišnje preživljenje CRC-a iznosi 97,6 % kod karcinoma *in situ* i CRC-a smještenih u submukozi (6). Odgovarajuće petogodišnje stope preživljenja s prisutnim metastazama iznose 60 % kod pacijenata s resektabilnom jetrom, 40 % s plućnim metastazama, i 20 % do 51 % među onima s peritonealnim metastazama. Dodatni prognostički čimbenici koju upućuju na lošiju prognozu jesu: slabija diferencijacija tumora, infiltrativni način rasta i nalaz tumora unutar krvnih i limfnih žila (9). Peritonealna karcinomatoza u CRC-u povezana je s vrlo lošom prognozom (31). Prema TNM klasifikaciji u bolesnika petogodišnje preživljenje bez nalaza metastaza u limfnim čvorovima iznosi 97 % (T1) do 63 % (T4). Nalaz pozitivnog limfnog čvora reducira preživljenje bez obzira na dubinu prodora tumora na 66 % (N1), tj. 37 % kod nalaza N2. Nalaz metastaza u udaljenim organima M1 reducira preživljenje na 4 % (6, 9). Tumorska perforacija neuobičajena je komplikacija raka debelog crijeva i povezana je s lošim ishodom zbog peritonitisa i sepse, uključujući visoku bolničku smrtnost i morbiditet (5).

### 2. CILJEVI

Ispitati učestalost mikrosatelitski nestabilnih karcinoma debelog crijeva u odnosu prema spolu, dobi i TNM stadiju bolesti, u dvogodišnjem razdoblju u Kliničkom bolničkom centru Osijek (KBCO).



### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je ustrojeno kao presječna studija s povijesnim podacima (32).

#### 3.2. Ispitanici (materijal)

Na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBCO-a rutinski se makroskopski i histološki pregledavaju uzorci debelog crijeva s karcinomom svih kolektomiranih ispitanika. U radu se koristila postojeća medicinska dokumentacija (arhiva) Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu kolektomiranih ispitanika operiranih u KBCO-u, od 2017. do 2018. godine. Analiza se obavljala i na postojećim arhivskim histološkim staklima sa standardnim (hemalaun-eozin) i imunohistokemijskim bojanjem.

#### 3.3. Metode

Za analizu se koristila postojeća medicinska dokumentacija (arhiva) Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu kolektomiranih ispitanika operiranih u KBCO-u, od 2017. do 2018. godine. Uzorci karcinoma debelog crijeva analizirani su morfološki i imunohistokemijski, pomoću mikroskopa marke Olympus®, model CX40, na postojećim arhivskim histološkim staklima, bojanim standardnim hemalaun-eozin i imunohistokemijskim bojanjem.

Imunohistokemijskom metodom, koja se radi na potpuno automatiziranom uređaju Ventana BenchMark ULTRA, određivala se mikrosatelitska nestabilnost karcinoma debelog crijeva. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine s obzirom na status mikrosatelitske nestabilnosti, na mikrosatelitski stabilne i mikrosatelitski nestabilne karcinome. Proteini prema kojima se određuje status mikrosatelitske stabilnosti/nestabilnosti su: MLH1 (engl. *MutL Protein Homolog 1*), MSH2 (engl. *MutS Protein Homolog 2*), MSH6 (engl. *MutS Protein Homolog 6*), te PMS2 (engl. *Postmeiotic Segregation Increased 2*) (22, 24).

#### 3.4. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su  $\chi^2$  testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Numerički podatci predstavljani su medijanom i

interkvartilnim rasponom (33). Sve P vrijednosti dvostrane su. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software version 18.11.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019).

## 4. REZULTATI

Od 1. siječnja 2017. do 31. prosinca 2018. godine u KBCO-u bilo je 308 karcinoma debelog crijeva. U istraživanje je bilo uključeno 244 ispitanika oboljelih od CRC-a. Iz istraživanja su isključeni ispitanici koji su primili neoadjuvantnu terapiju i koji nemaju imunohistokemijski učinjenu ekspresiju proteina za popravak DNA.

Središnja vrijednost (medijan) dobi ispitanika iznosi 68 godina, s granicama interkvartilnog raspona 61 do 77 godina, od najmanje 31 do najviše 95 godina. Od 244 ispitanika 125 (51 %) su muškarci, a 119 (49 %) je žena. Ispitanici su najčešće bili u dobi 60 do 69 godina. Muškarci su najčešće bili u dobnoj skupini od 60 do 69 godina 55 (63 %), a žene u dobnoj skupini od 70 do 79 godina 39 (58 %). Starijih od 60 godina bilo je 197 (81 %). Nema značajne razlike u dobi u odnosu na spol (Tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Učestalost kolorektalnog karcinoma prema dobi u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 244)

	Broj (%) ispitanika								P*
	30 – 39	40 – 49	50 – 59	60 – 69	70 – 79	80 – 89	90 – 99	UKUPNO	
Muškarci	1/2	6/14	16 (52)	55 (63)	28 (42)	19 (46)	0	125 (51)	0,11
Žene	1/2	8/14	15 (48)	32 (37)	39 (58)	22 (54)	2/2	119 (49)	
Ukupno	2/2	14/14	31 (100)	87 (100)	67 (100)	41 (100)	2/2	244 (100)	

\* $\chi^2$  test

Veličina tumora kretala se od 1 cm do 20 cm. Četvero (2 %) ispitanika imalo je tumore veće od 10 cm. Najčešće su to bili tumori veličine  $> 2$  i  $\leq 5$  cm, kod 147 ispitanika (60 %), najčešće su bili lokalizirani rektosigmoidno, kod 89 ispitanika (60 %), što je ujedno i najčešća lokalizacija, kod 148 ispitanika (61 %) (Tablica 4.2.).

Tablica 4.2. Raspodjela lokalizacije kolorektalnog karcinoma prema veličini kolorektalnog karcinoma u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 244)

Lokalizacija	Broj (%) ispitanika u odnosu na veličinu					P*
	≤ 2 cm	> 2 i ≤ 5 cm	> 5 i ≤ 10 cm	> 10 cm	UKUPNO	
Cekoascendens	0	29 (20)	21 (26)	0	50 (20)	0,27
Transversum	1/11	15 (10)	8 (10)	0	24 (10)	
Descendens	0	10 (7)	3 (3)	0	13 (5)	
Rektosigmoid	10/11	89 (60)	46 (56)	3/4	148 (61)	
Multiple lokalizacije	0	4 (3)	4 (5)	1/4	9 (4)	
Ukupno	11/11	147 (100)	82 (100)	4/4	244 (100)	

\* $\chi^2$  test

Prema AC klasifikaciji tumori su najčešće bili C2 stadija, kod 106 (43 %) ispitanika. Samo jedan tumor imalo je 235 (96 %) ispitanika, a 9 ispitanika (4 %) 2 ili više tumora. C2 stadij najčešće je bio zastupljen kod 100 (43 %) ispitanika s jednim tumorom i kod 6 (67 %) ispitanika s više tumora (Tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Raspodjela kolorektalnih karcinoma prema Astler – Collerovoj klasifikaciji, u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 244)

ASTLER – COLLER	Jedan tumor	Više tumora	Ukupno	%
B1	36 (15)	1/9	37	15
B2	77 (33)	1/9	78	32
C1	9 (4)	0	9	4
C2	100 (43)	6/9	106	43
D	13 (5)	1/9	14	6
UKUPNO	235 (100)	9/9	244	100

Najčešći TNM stadij tumora bio je stadij 3, kod 116 (47 %) ispitanika, a najmanje ispitanika, njih 14 (6 %) imalo je stadij 4 (Tablica 4.4.).

Tablica 4.4. Raspodjela kolorektalnog karcinoma prema TNM stadiju, u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 244)

TNM* STADIJ	Broj ispitanika	%
Stadij 1	37	15
Stadij 2	77	32
Stadij 3	116	47
Stadij 4	14	6
UKUPNO	244	100

\*T-tumor, N-nodus, M-metastaza

Ispitanici, njih 143 (61 %), koji su imali samo jedan tumor, najčešće su imali tumor veličine od 2 do 5 cm, s rektosigmoidnom lokalizacijom, kod 89 (62 %) ispitanika. Najčešća lokalizacija tumora je rektosigmoidna kod 148 (63 %) ispitanika. Nema značajnih razlika u veličini tumora u odnosu na lokalizaciju (Tablica 4.5.).

Tablica 4.5. Raspodjela ispitanika, prema lokalizaciji i veličini, koji imaju samo jedan tumor u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 235)

Lokalizacija	Broj (%) ispitanika prema veličini					P*
	≤ 2 cm	> 2 ≤ 5 cm	> 5 ≤ 10 cm	> 10 cm	Ukupno	
Cekoascendens	0	29 (20)	21 (27)	0	50 (21)	0,48
Transversum	1/11	15 (11)	8 (10)	0	24 (10)	
Descendens	0	10 (7)	3 (4)	0	13 (6)	
Rektosigmoid	10/11	89 (62)	46 (59)	3/3	148 (63)	
Ukupno	11/11	143 (100)	78 (100)	3/3	235 (100)	

\* $\chi^2$  test

Prema AC klasifikaciji najčešće je bilo tumora C2 klasifikacije, kod 100 (43 %) ispitanika i najčešće rektosigmoidne lokalizacije kod 148 (63 %). Rektosigmoidnih tumora C2 klasifikacije bilo je kod 60 (60 %) ispitanika. Nema značajnih razlika u AC klasifikaciji prema lokalizaciji tumora (Tablica 4.6.).

Tablica 4.6. Raspodjela ispitanika, prema Astler – Collerovoj klasifikaciji i lokalizaciji, koji imaju samo jedan tumor u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 235)

Astler – Coller	Broj (%) ispitanika s obzirom na lokalizaciju					P*
	Cekoascendens	Transversum	Descendens	Rektosigmoid	Ukupno	
B1	3 (6)	4 (17)	3/13	26 (18)	36 (15)	0,24
B2	16 (32)	9 (38)	6/13	46 (31)	77 (33)	
C1	0	2 (8)	0	7 (5)	9 (4)	
C2	29 (58)	7 (29)	4/13	60 (40)	100 (43)	
D	2 (4)	2 (8)	0	9 (6)	13 (5)	
UKUPNO	50 (100)	24 (100)	13/13	148 (100)	235 (100)	

\* $\chi^2$  test

Ispitanici, njih 143 (61 %), koji su imali samo jedan tumor, najčešće su bili veličine  $> 2 \leq 5$  cm, najčešće C2 stadija, kod 62 (43 %) ispitanika, što je ujedno i najčešća klasifikacija CRC-a, prisutna kod 100 (43 %) ispitanika (Tablica 4.7.).

Tablica 4.7. Raspodjela ispitanika, prema Astler – Collerovoj klasifikaciji i veličini kolorektalnog karcinoma, koji imaju samo jedan tumor u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 235)

ASTLER – COLLER	Broj (%) ispitanika s obzirom na veličinu					P*
	$\leq 2$ cm	$> 2 \leq 5$ cm	$> 5 \leq 10$ cm	$> 10$ cm	UKUPNO	
B1	4/11	25 (17)	7 (9)	0	36 (15)	0,12
B2	2/11	45 (32)	29 (37)	1/3	77 (33)	
C1	2/11	5 (4)	2 (3)	0	9 (4)	
C2	3/11	62 (43)	33 (42)	2/3	100 (43)	
D	0	6 (4)	7 (9)	0	13 (5)	
UKUPNO	11/11	143 (100)	78 (100)	3/3	235 (100)	

\* $\chi^2$  test

Od 244 ispitanika njih 219 (90 %) bilo je s MSS karcinomom, a 25 ispitanika (10 %) s MSI karcinomom. Najčešća lokalizacija MSS-a bila je rektosigmoidina kod 142 (65 %) ispitanika, dok je kod MSI karcinoma to bila cekoascendentna lokalizacija kod 13 (52 %) ispitanika. Značajna je razlika u lokalizaciji u odnosu na stabilnost ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 4.8.).

Tablica 4.8. Raspodjela mikrosatelitski stabilnih i mikrosatelitski nestabilnih kolorektalnih karcinoma prema lokalizaciji u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 244)

Lokalizacija	Broj (%) ispitanika			P*
	STABILNI	NESTABILNI	UKUPNO	
Cekoascendens	37 (17)	13 (52)	50 (20)	<b>&lt; 0,001</b>
Transverzum	20 (9)	4 (16)	24 (10)	
Descendens	12 (5)	1 (4)	13 (5)	
Rektosigmoid	142 (65)	6 (24)	148 (61)	
Multipli tumori	8 (4)	1 (4)	9 (4)	
Ukupno	219 (100)	25 (100)	244 (100)	

\* $\chi^2$  test

Najčešća veličina MSI karcinoma bila je  $> 5 \leq 10$  cm, izmjerena kod 13 (52 %) ispitanika, dok je najčešća veličina MSS karcinoma bila  $> 2 \leq 5$  cm, izmjerena kod 136 (62 %) ispitanika, te je to ujedno i najčešća veličina CRC-a, prisutna kod 147 (60 %) ispitanika (Tablica 4.9.).

Tablica 4.9. Raspodjela mikrosatelitski stabilnih i mikrosatelitski nestabilnih karcinoma prema veličini u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 244)

VELIČINA	Broj (%) ispitanika			P*
	Stabilni	Nestabilni	Ukupno	
$\leq 2$ cm	11 (5)	0	11 (4)	0,10
$> 2 \leq 5$ cm	136 (62)	11 (44)	147 (60)	
$> 5 \leq 10$ cm	69 (32)	13 (52)	82 (34)	
$> 10$ cm	3 (1)	1 (4)	4 (2)	
UKUPNO	219 (100)	25 (100)	244 (100)	

\* $\chi^2$  test

Najčešći stadij CRC-a prema AC klasifikaciji je bio C2, kod 106 (43 %) ispitanika, koji je ujedno najčešći stadij i kod MSS karcinoma, kod 95 (43 %) ispitanika i kod MSI karcinoma, kod 11 (44 %) ispitanika (Tablica 4.10.).

Tablica 4.10. Raspodjela mikrosatelitski stabilnih i mikrosatelitski nestabilnih kolorektalnih karcinoma prema Astler – Collerovoj klasifikaciji u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 244)

Astler – Coller	Broj (%) ispitanika			P*
	STABILNI	NESTABILNI	UKUPNO	
B1	34 (16)	3 (12)	37 (15)	0,75
B2	68 (31)	10 (40)	78 (32)	
C1	9 (4)	0	9 (4)	
C2	95 (43)	11 (44)	106 (43)	
D	13 (6)	1 (4)	14 (6)	
UKUPNO	219 (100)	25 (100)	244 (100)	

\* $\chi^2$  test

TNM stadij 3 bio je najčešći stadij CRC-a prisutan kod 116 (47 %) karcinoma, koji je ujedno i najčešći stadij kod MSS i MSI karcinoma, bez značajnih razlika u odnosu na stabilnost (Tablica 4.11.).

Tablica 4.11. Raspodjela mikrosatelitski stabilnih i mikrosatelitski nestabilnih karcinoma prema TNM stadiju u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine (N = 244)

TNM* STADIJ	Broj (%) karcinoma			P†
	STABILNI	NESTABILNI	UKUPNO	
STADIJ 1	34 (16)	3 (12)	37 (15)	0,92
STADIJ 2	68 (31)	9 (36)	77 (32)	
STADIJ 3	104 (47)	12 (48)	116 (47)	
STADIJ 4	13 (6)	1 (4)	14 (6)	
UKUPNO	219 (100)	25 (100)	244 (100)	

\*T-tumor, N-nodus, M-metastaza, † $\chi^2$  test,

Kod mikrosatelitski nestabilnih karcinoma (25 ispitanika) bilo je 11 muškaraca (44 %) i 14 žena (56 %). Raspon dobi ispitanika s MSI karcinomom bio je od 46 do 85 godina. Njih 24 imalo je jedan tumor, dok je jedan ispitanik imao 3 tumora. Najčešća učestalost negativnosti proteina kod MSI karcinoma bila je negativnost MLH1 proteina 14 (56 %) (Tablica 4.12.).



Tablica 4.12. Učestalost negativnosti proteina mikrosatelitski nestabilnih kolorektalnih karcinoma u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine

	Broj (%) karcinoma
MSH2*	1 (4)
MSH6†	10 (40)
MLH1‡	14 (56)
PMS2§	13 (52)

\*MSH2 – engl. *MutS Protein Homolog 2*, †MSH6 – engl. *MutS Protein Homolog 6*, ‡MLH1 – engl. *MutL Protein Homolog 1*, §PMS2 – engl. *Postmeiotic Segregation Increased 2*

Jedan negativan protein je imalo 12 ispitanika (48 %), dok je dva negativna proteina, različitih kombinacija, imalo 13 ispitanika (52 %). Najčešće prisutan jedan negativan protein kod MSI karcinoma bio je MSH6, kod 7/12 karcinoma (Tablica 4.13.).

Tablica 4.13. Učestalost negativnosti samo jednog proteina mikrosatelitski nestabilnih kolorektalnih karcinoma u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine

	Broj karcinoma
MSH2*	0
MSH6†	7/12
MLH1‡	3/12
PMS2§	2/12
UKUPNO	12/12

\*MSH2 – engl. *MutS Protein Homolog 2*, †MSH6 – engl. *MutS Protein Homolog 6*, ‡MLH1 – engl. *MutL Protein Homolog 1*, §PMS2 – engl. *Postmeiotic Segregation Increased 2*

Dva negativna proteina, različitih kombinacija, kod MSI karcinoma bila su prisutna kod 13 (52 %) karcinoma. MLH1/PMS2 bila je najčešća kombinacija negativnosti proteina MSI karcinoma, kod 10/13 karcinoma (Tablica 4.14.).

Tablica 4.14. Učestalost kombinacije negativnosti proteina mikrosatelitski nestabilnih kolorektalnih karcinoma u Kliničkom bolničkom centru Osijek, od 2017. do 2018. godine

	Broj karcinoma
MLH1 <sup>*</sup> /PMS2 <sup>†</sup>	10/13
MSH2 <sup>‡</sup> /MSH6 <sup>§</sup>	1/13
MSH6/MLH1	1/13
MSH6/PMS2	1/13
UKUPNO	13/13

<sup>\*</sup>MLH1 – engl. *MutL Protein Homolog 1*, <sup>†</sup>PMS2 – engl. *Postmeiotic Segregation Increased 2*

<sup>‡</sup>MSH2 – engl. *MutS Protein Homolog 2*, <sup>§</sup>MSH6 – engl. *MutS Protein Homolog 6*

Najčešće prisutan jedan negativan protein kod MSI karcinoma bio je MSH6, kod 7/12 karcinoma. Ukupno je bilo 12 (48 %) ispitanika s prisutnim jednim negativnim proteinom.

## 5. RASPRAVA

Ovo presječno povijesno istraživanje provedeno je analizom patohistoloških nalaza ispitanika oboljelih od CRC-a s ispitivanom ekspresijom gena za popravak DNA. Mikrosatelitska nestabilnost određivala se imunohistokemijskom metodom. Karcinogeneza MSI-a poseban je mehanizam nastanka tumora i ispitivanjem MSI-a u tkivu karcinoma izdvajamo tu grupu kao poseban entitet u sklopu CRC-a. MSI CRC-i su skupina tumora s posebnim kliničkim i patohistološkim odlikama, odlikuju se boljom prognozom te drugačije odgovaraju na kemoterapiju od MSS CRC-a.

Analizirano je 244 ispitanika oboljela od CRC karcinoma, od toga 125 (51 %) muškaraca, a 119 (49 %) žena. Ispitanici su najčešće bili u dobi 60 do 69 godina, njih 36 %, što je slično studiji gdje su ispitanici u toj dobnoj skupini bili zastupljeni 33 % (34). Epidemiološki podaci ispitanika u skladu su s literaturnim podacima koji ukazuju na predominaciju muškog spola te najčešću pojavnost bolesti u šestom desetljeću života (8, 34). U provedenom istraživanju statistički nema značajne razlike u dobi u odnosu na spol. Raspon dobi naših ispitanika bio je 31 – 95 godina, što je slično jednoj studiji u kojoj je raspon dobi bio 26 – 92 godine, dok je u drugom istraživanju raspon dobi bio od 14 – 90 godina (35–37). Medijan dobi ispitanika je 68 godina, slično s jednim provedenim istraživanjem gdje je medijan dobio bio 61 godina, dok je u drugoj studiji medijan dobi bio 54 godine života (8, 35–38). Samo 7 % ispitanika bilo je ispod 50 godina, što je slično navodima iz literature gdje su CRC vrlo rijetki prije 40. godine života, osim kod pojedinaca s genetskom predispozicijom ili onih s kroničnim upalnim crijevnim bolestima (8, 34, 49).

Veličina tumora kretala se od 1 do 20 cm. Četiri ispitanika imalo je tumore veće od 10 cm. U provedenom istraživanju najčešća veličina tumora bila je od 2 do 5 cm. Iako prema navodima iz literature desnostrani tumori (smješteni cekoascendentno i u transversumu) često rastu egzofitično i većeg su promjera za razliku od lijevostranih (smješteni descendetno i rektosigmoidno) koji su manji i ulcerirani, to se nije pokazalo statistički značajnim ( $\chi^2$  test,  $P = 0,27$ ) (34). Samo jedan tumor imalo je 235 ispitanika, a 9 ispitanika 2 ili više tumora. Najčešća lokalizacija tumora bila je rektosigmoidno, što je slično navodima iz literature. U provedenim studijama lijevostrani tumori bili prisutni kod 75 %, dok su u ovom istraživanju bili prisutni kod 66 % ispitanika (17, 37, 40).

Najčešći stadij tumora prema AC klasifikaciji bio je C2, nađen kod 43 % ispitanika, što je različito od jedne druge studije, gdje je najčešći stadij tumora bio B2 (27 %) (36). U ovom istraživanju B2 stadij bio je zastupljen u 32 % ispitanika.

Najčešći TNM stadij tumora bio je stadij 3, kod 116 (48 %) ispitanika, što je slično studiji gdje je bilo 45 % ispitanika sa stadijem 3 CRC-a (35, 38). Najmanje ispitanika, njih 14 (6 %), imalo je stadij 4, što je slično navodima iz literature (6, 35, 38, 41).

Od 244 ispitanika njih 219 (90 %) bilo je s MSS-om, a 25 (10 %) ispitanika s MSI CRC-om, što je slično podacima iz literature, gdje se navodi da je postotak MSI karcinoma 15 %, a u jednoj provedenoj studiji bilo je 9 % MSI karcinoma (3, 17, 37–39). Najčešća lokalizacija MSS-a bila je rektosigmoidina, i to kod 142 (65 %) ispitanika, dok je kod MSI karcinoma to bila cekoascendentna lokalizacija, kod 13 (52 %) ispitanika. Statistički postoji značajna razlika u lokalizaciji u odnosu na stabilnost ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ), što je slično navodima iz jedne provedene studije, gdje je od 6 % oboljelih od MSI CRC-a njih 63 % bilo lokalizirano u desnostranom kolonu (17, 35, 38, 39). U jednoj drugoj studiji lokalizacija MSI CRC-a u desnostranom kolonu bila je kod 68 % ispitanika, a lijevostrana lokalizacija kod 32 % ispitanika (17, 37, 40). Najčešća veličina MSI karcinoma bila je  $> 5 \leq 10$  cm, izmjerena kod 13 (52 %) ispitanika, dok je najčešća veličina MSS karcinoma bila  $> 2 \leq 5$  cm, izmjerena kod 136 (62 %) ispitanika. Veličina  $> 2 \leq 5$  cm ujedno je i najčešća veličina CRC-a, prisutna kod 147 (60 %) ispitanika, što je slično jednom provedenom istraživanju u kojemu su CRC-i  $> 5$  cm kod MSI-a bili zastupljeni kod 73 %, a MSS-i u toj veličini kod 41 % ispitanika (17, 39). Kako su MSS CRC-i agresivniji, raspodjela MSS-a i MSI CRC-a prema veličini nije se statistički pokazala značajnom ( $\chi^2$  test,  $P = 0,1$ ). U ovom istraživanju C2 stadij AC klasifikacije bio je najčešći i kod MSS karcinoma, utvrđen kod 95 ispitanika (43 %) i kod MSI karcinoma, utvrđen kod 11 ispitanika (44 %), što je različito od jedne provedene studije, gdje je najčešći stadij i kod MSS-a (30 %) i MSI-a (38 %) CRC-a bio B2 (36).

Stadij 3 bio je najčešći TNM stadij CRC-a, prisutan kod 116 (47 %) karcinoma, te je to ujedno i najčešći stadij kod MSS i MSI karcinoma, bez značajnih razlika u odnosu na stabilnost, što se razlikuje od literaturnih podataka, gdje je učestalost stadija 2 kod ispitanika s MSI CRC-om bila 52 %, te su MSI karcinomi bili prisutni u nižim stadijima razvoja po TNM klasifikaciji nego MSS CRC-i (17). Nije utvrđena statistički značajna razlika stabilnosti i TNM stadija CRC-a ( $\chi^2$  test,  $P = 0,92$ ) (28). Najmanje ispitanika kod MSI karcinoma bilo je u stadiju 4 (4%), što je u

skladu s literaturnim podacima, gdje se navodi da su rijetki među metastatskim tumorima (29, 41).

U MSI grupi bilo je 11 muškaraca (44 %) te 14 žena (56 %), što je slično s literaturnim podacima, gdje ima više oboljelih žena od muškaraca te je u jednoj provedenoj studiji bilo 59 % žena, a 41 % muškaraca (34, 36). Iako je u dvije provedene studije to bila predominacija muškog spola sa 67 % i 64 % oboljelih muškaraca (17, 34). Raspon dobi ispitanika s MSI CRC-om iznosi od 46 do 85 godina, što je slično jednoj provedenoj studiji u kojoj je raspon dobi kod MSI CRC-a bio od 26 do 78 godina (35). Njih 24 imalo je jedan tumor, dok je jedan ispitanik imao 3 tumora.

Jedan negativan protein imalo je 12 (48 %) ispitanika, dok je dva negativna proteina imalo 13 (52 %). Najčešća učestalost negativnosti proteina kod MSI CRC-a bila je negativnost MLH1 proteina 14 (56 %), što je slično prema navodima iz literature gdje se negativnost MLH1 i PMS2 nalaze u više od 90 % slučajeva (29, 34). MLH1/PMS2 bila je najčešća kombinacija negativnosti proteina MSI karcinoma, kod 10/13 karcinoma, što se slaže s literaturnim podacima (34). Najčešće prisutan jedan negativan protein kod MSI karcinoma bio je MSH6, kod 7/12, što je slično literaturnim podacima (34).

Postoji veliki značaj određivanja statusa MSI CRC-a zbog drugačijeg odgovora na terapiju, drugačije prognoze bolesti te drugačije lokalizacije MSS i MSI CRC-a. MSI tumori imaju povoljniju prognozu i manje su skloni metastazi u limfne čvorove i udaljene metastaze nego MSS tumori (24, 29, 38, 40). MSI CRC-i otporni su na 5-FU i kapecitabin, ali mogu biti osjetljivi na irinotekan i mitomicin C (3). Uočeno je bolje preživljavanje u bolesnika s MSI CRC-om, koji su primali pembrolizumab, anti-PD-1 (engl. *programmed death-1*) monoklonskog protutijela koji blokira taj put, čime se sprječava apoptoza limfocita koji infiltriraju tumor. Zbog toga MSI može biti prediktivni marker u odabiru pacijenata koji imaju koristi od anti-PD-1 imunoterapije (25).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- MSI karcinom bio je češći kod žena nego kod muškaraca no nema statistički značajne razlike.
- Nije zabilježena razlika u veličini MSS i MSI karcinoma.
- MSI karcinom češće je lokaliziran u desnostranom za razliku od MSS karcinoma koji je češće lokaliziran u lijevostranom kolonu.
- Nema razlike u Astler – Collerovoj klasifikaciji MSS i MSI karcinoma.
- Nije zabilježena razlika MSS i MSI karcinoma prema TNM stadijima.
- Od istraživanih proteina za mikrosatelitsku stabilnost/nestabilnost (MLH1 (engl. *MutL Protein Homolog 1*), MSH2 (engl. *MutS Protein Homolog 2*), MSH6 (engl. *MutS Protein Homolog 6*), PMS2 (engl. *Postmeiotic Segregation Increased 2*) po jedan negativan protein zabilježen je kod 12 ispitanika (48 %), dok su dva negativna proteina, u različitim kombinacijama, zabilježena kod 13 ispitanika (52 %).
- Dobivena učestalost MSI karcinoma od 10 % ukazuje na važnost određivanja enzima za popravak DNA kod svih pacijenata s kolorektalnim karcinomom jer za razliku od MSS karcinoma, MSI karcinomi reagiraju na drugačiju terapiju te su drugačije prognoze.

## 7. SAŽETAK

**MIKROSATELITNA NESTABILNOST ADENOKARCINOMA DEBELOG CRIJEVA**

**Cilj:** Ispitati učestalost mikrosatelitski nestabilnih kolorektalnih karcinoma (CRC) u odnosu na spol, dob i TNM stadij bolesti, u dvogodišnjem razdoblju u Kliničkom bolničkom centru Osijek (KBCO).

**Nacrt istraživanja:** Istraživanje je bilo presječno s povijesnim podacima.

**Ispitanici i metode:** Analiza postojeće medicinske dokumentacije Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu 244 kolektomiranih ispitanika operiranih u KBCO-u od 2017. do 2018. godine te postojećih arhivskih histoloških stakala sa standardnim (hemalaun-eozin) i imunohistokemijskim bojanjem, kojim su određivani MLH1 (engl. *MutL Protein Homolog 1*), MSH2 (engl. *MutS Protein Homolog 2*), MSH6 (engl. *MutS Protein Homolog 6*), te PMS2 (engl. *Postmeiotic Segregation Increased 2*) proteini.

**Rezultati:** Od 244 ispitanika 125 (51 %) su muškarci, a 119 (49 %) je žena. Središnja vrijednost dobi ispitanika iznosi 68 godina. Ispitanici su analizirani s obzirom na status mikrosatelitske nestabilnosti, MSS (mikrosatelitski stabilni karcinomi) te MSI (mikrosatelitski nestabilni karcinomi). Ispitanika s MSS karcinoma bilo je 219 (90 %), a 25 ispitanika (10 %) s MSI karcinomom. Uspoređujući te dvije skupine nije statistički bilo značajne razlike prema veličini ( $\chi^2$  test,  $P = 0,10$ ), prema Astler – Collerovoj klasifikaciji ( $\chi^2$  test,  $P = 0,75$ ), prema TNM stadijima ( $\chi^2$  test,  $P = 0,92$ ). Statistički je značajna razlika u lokalizaciji u odnosu na stabilnost ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ), gdje je 52 % MSI ispitanika imalo lokalizaciju cekoascendetno, a 65 % MSS ispitanika lokalizaciju rektosigmoidno. Jedan negativan protein zabilježen je kod 12 ispitanika (48 %), dok su dva negativna proteina, u različitim kombinacijama, zabilježena kod 13 ispitanika (52 %).

**Zaključak:** Dobivena učestalost od 10 % MSI karcinoma opravdava imunohistokemijsko ispitivanje enzima za popravak DNA. Zbog značajno češće lokalizacije MSI CRC-a u desnostranom kolonu te drugačijeg odgovora na terapiju potrebno je dati veći značaj MSI CRC-u.

**Ključne riječi:** imunohistokemija; kolorektalni karcinom; mikrosatelitska nestabilnost; mikrosatelitska stabilnost; MLH1; MSH2; MSH6; PMS2

## 8. SUMMARY

**MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL CANCER**

**Objective:** The aim of this study was to determine the incidence of microsatellite instability of colorectal carcinomas (CRC) according to gender, age, and TNM stage. Study was conducted during two years at the Clinical Hospital Centre Osijek (CHCO).

**Study design:** Cross sectional study with the archive data.

**Participants and methods:** Analysis included archive data taken from Clinical department of pathology at CHCO. Study included 244 respondents, all of whom underwent colectomy in 2017 and 2018. We analysed present histological samples dyed with both standard (haematoxylin-eosin) and immunohistochemical (IHC) methods. We used IHC methods to determine MLH1 (MutL Protein Homolog 1), MSH2 (MutS Protein Homolog 2), MSH6 (Mut Protein homolog 6), and PMS2 (Postmeiotic Segregation Increased 2) proteins.

**Results:** Out of the total number of 244 respondents, 155 (51%) were male and 119 (49%) were female. Median patient age was 68 years. Respondents' data was analysed in view of microsatellite instability status, MSS (Microsatellite stable carcinomas) and MSI (microsatellite unstable carcinomas). There were 219 respondents with MSS carcinoma (90%), and 25 respondents with MSI type carcinoma (10%). There were no significant differences between those two groups in tumor size ( $\chi^2$  test,  $P=0.10$ ), Astler – Coller classification ( $\chi^2$  test,  $P=0.75$ ), and TNM stage ( $\chi^2$  test,  $P=0.92$ ). Statistically significant difference was found in cancer stability ( $\chi^2$  test,  $P < 0.001$ ). MSI carcinomas were found in ascendant colon in 52% of respondents, whereas 65% of the respondents had MSS carcinoma localised in colorectal part. One negative protein was found in 12 respondents (48%), while two negative proteins, in various combinations, were found in 13 respondents (52%).

**Conclusion:** We can conclude that 10% incidence of MSI carcinomas justifies IHC examining of DNA repair enzymes. Because of more frequent localisation of MSI CRC in the right colon with different reaction to therapy, a higher significance should be given to this type of tumour.

**Key words:** colorectal cancer; immunohistochemistry; microsatellite instability; microsatellite stability; MLH1; MSH2; MSH6; PMS2



## 9. LITERATURA

1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
2. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008.
3. Gatalica Z, Vranic S, Xiu J, Swensen J, Reddy S. High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine. *Fam Cancer*. 2016;15(3):405-12.
4. Šekerija M, ur. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. Bilten br. 40. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2018.
5. Washington MK, Berlin J, Branton P, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL i sur. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(10):1539-51.
6. Akkoca AN, Yanık S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG i sur. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(9):2828-35.
7. Riddel R, Jain D. Lewin, Weinstein, and Riddell's Gastrointestinal Pathology and Its Clinical Implications. 2. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2014.
8. Hamilton SR, Aaltonen LA, ur. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press; 2000.
9. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, ur. Patologija. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
10. Kuriki K, Tajima K. The Increasing Incidence of Colorectal Cancer and the Preventive Strategy in Japan. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2006;7(3):495-501.
11. Samardžić S, Mihaljević S, Dmitrović B, Milas J, Puntarić D, Tadijan D i sur. First Six Years of Implementing Colorectal Cancer Screening in the Osijek - Baranja County, Croatia – Can We Do Better?. *Coll. antropol*. 2013;37(3):913-8.

12. Bailey CE, Hu CY, You YN, Bednarski BK, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM i sur. Increasing Disparities in Age-Related Incidence of Colon and Rectal Cancer in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg.* 2015;150(1):17–22.
13. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E i sur. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One.* 2011;6(6):e20456.
14. Ma P, Yao Y, Sun W, Dai S, Zhou C. Daily sedentary time and its association with risk for colorectal cancer in adults: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(22):e7049.
15. Fletcher CDM, ur. *Diagnostic histopathology of tumors.* 4. izd. Philadelphia: Saunders; 2013.
16. Vrdoljak E, Belac-Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. *Klinička onkologija.* 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
17. Jung SH, Kim SH, Kim JH. Prognostic Impact of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer Presenting With Mucinous, Signet-Ring, and Poorly Differentiated Cells. *Ann Coloproctol.* 2016;32(2):58-65.
18. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, ur. *AJCC, Cancer Staging Manual,* 7.izd. Chicago: Springer; 2010.
19. Hari DM, Leung AM, Lee JH, Sim MS, Vuong B, Chiu CG i sur. AJCC Cancer Staging Manual 7th edition criteria for colon cancer: do the complex modifications improve prognostic assessment?. *J Am Coll Surg.* 2013;217(2):181-90.
20. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012;5(1):19-27.
21. Chen VW, Hsieh MC, Charlton ME, Ruiz BA, Karlitz J, Altekruse SF i sur. Analysis of stage and clinical/prognostic factors for colon and rectal cancer from SEER registries: AJCC and collaborative stage data collection system. *Cancer.* 2014;120 Suppl 23(0):3793-806.
22. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(3):153-62.
23. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW i sur. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection

- and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 1998;58(22):5248-57.
24. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87.e3.
  25. Lin EI, Tseng LH, Gocke CD, Reil S, Le DT, Azad NS i sur. Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncotarget.* 2015;6(39):42334-44.
  26. Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Järvinen HJ i sur. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer.* 2008;123(2):444-9.
  27. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB i sur. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(3):193-201.
  28. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD i sur. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology.* 2008;135(2):419-28.
  29. Kawakami H, Zaanani A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2015;16(7):30.
  30. de Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MG i sur. Microsatellite Instability, Immunohistochemistry, and Additional PMS2 Staining in Suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(3):972-80.
  31. Franko J, Shi Q, Goldman CD, Pockaj BA, Nelson GD, Goldberg RM i sur. Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: a pooled analysis of north central cancer treatment group phase III trials N9741 and N9841. *J Clin Oncol.* 2011;30(3):263-7.
  32. Marušić M i sur. *Principles of Research in Medicine.* 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2016.
  33. Ivanković D i sur. *Osnove statističke analize za medicinare.* Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1988.
  34. Karahan B, Argon A, Yıldırım M, Vardar E. Relationship between MLH-1, MSH-2, PMS-2, MSH-6 expression and clinicopathological features in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(4):4044–53.

35. Hong SP, Min BS, Kim TI, Cheon JH, Kim NK, Kim H i sur. The differential impact of microsatellite instability as a marker of prognosis and tumour response between colon cancer and rectal cancer. *Eur J Cancer*. 2012;48(8):1235-43.
36. Raskin L, Dakubo JC, Palaski N, Greenson JK, Gruber SB. Distinct molecular features of colorectal cancer in Ghana. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(5):556–61.
37. Kim CG, Ahn JB, Jung M, Beom SH, Kim C, Kim JH i sur. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2016;115(1):25–33.
38. Yan WY, Hu J, Xie L, Cheng L, Yang M, Li L i sur. Prediction of biological behavior and prognosis of colorectal cancer patients by tumor MSI/MMR in the Chinese population. *Onco Targets Ther*. 2016;9:7415–24.
39. Kim HR, Kim HC, Yun HR, Kim SH, Park CK, Cho YB i sur. An alternative pathway in colorectal carcinogenesis based on the mismatch repair system and p53 expression in Korean patients with sporadic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(12):4031-40.
40. Kang S, Na Y, Joung SY, Lee SI, Oh SC, Min BW. The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(9):e0019.
41. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev*. 2016;51:19-26.

10. ŽIVOTOPIS

Antonija Kašuba, studentica 6. godine  
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku  
Medicinski fakultet Osijek  
Sveučilišni integrirani preddiplomski i  
diplomski studij medicine  
Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek  
Tel. +38531399641

Datum i mjesto rođenja:  
1. lipnja 1994., Našice  
Kućna adresa:  
Miroslava Kraljevića 12, 31500 Našice  
Tel. +385917558184  
E-mail: kasuba.antonija@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2001. – 2009. Osnovna škola kralja Tomislava u Našicama  
2002. – 2008. Osnovna glazbena škola kontesa Dora u Našicama  
2009. – 2013. Prirodoslovno - matematička gimnazija Našice  
2013. – 2019. Medicinski fakultet Osijek, Studij medicine

OSTALO:

2017. – 2019. – stipendistica Osječko-baranjske županije  
24. travnja 2018. – Dani studenata medicinskog fakulteta Osijek – DAMEO 2018., pasivni  
sudionik